肺癌腫瘍浸潤リンパ球の抗腫瘍活性の誘導とその賦活に関する研究

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 渡辺, 進一郎
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8228

金沢大学十全医学会雑誌　第99巻　第6号　947－962（1990）

肺癌腫瘍浸潤リンパ球の抗腫瘍活性の誘導とその賦活に関する研究

金沢大学医学部外科学第一講座（主任：岩　喬教授）
渡　辺　進一郎

（平成2年10月29日受付）

肺癌患者に対する補助療法として，より効果的な養子免疫療法を行なうことの基礎研究として，腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocyte, TIL) を中心とした各種リンパ球の培養後のナチュラルキラー (natural killer, NK) 活性，リンホカイン賦活化キラー (lymphokine activated killer, LAK) 活性，自己腫瘍 (autologous tumor, AT) に対する細胞傷害活性ならびに表面マーカーについて検討した．その結果，TIL の NK 活性は所属リンパ節リンパ球 (regional lymph node lymphocyte, RLNL) と同様に末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocyte, PBL) に比較して有意に低く，その抗腫瘍活性は著明に抑制されていることが明らかになった．しかし，TIL を OK-432 あるいはリコンビナントインターロイキン- (recombinant interleukin-2, rIL-2) 存在下にて培養すると (RLNL や PBL を用いた場合と比較すると有意に低いが) NK 活性，LAK 活性，AT に対する活性が20％以上の細胞を誘導することができた。TIL の表面マーカーは T 細胞優位であり，B 細胞やマクロファージ，さらには NK 細胞のマーカーをもつリンパ球は少数であった．培養によって T 細胞の割合がふえ，特に分化群 (Cluster of Differentiation, CD) 8 陽性細胞が有意に増加した．以上の結果から，TIL には AT に傷害活性をもつリンパ球が存在する可能性が考えられた．そこで PBL を用いて TIL のシミュレーション (リンパ球混合培養試験) を作製し，誘導されたリンパ球の細胞傷害活性などを詳細に検討し，TIL の場合と比較した．誘導されたアロジェニック作働細胞 (allogenic effector cell) の標的細胞に対する活性は，NK 活性よりもむしろ LAK 活性に対して強い相関関係を示した．これらのことより，TIL を培養することによって AT に対して細胞傷害活性を有する LAK 細胞を誘導できることが明らかになった．また自己末梢血ブラスト化リンパ球に活性を有しない TIL が誘導できた．したがって誘導された活性化 TIL には AT に対し特異性を有する細胞傷害性 T 細胞が一部存在することが推定され，TIL の AT に対する細胞傷害活性は細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) および LAK 細胞の活性であると考えられた．TIL による養子免疫療法の臨床応用として癌性胸膜炎患者の胸腔内に TIL-LAK 細胞＋rIL-2 を注入し，胸水の消失を認めた．

Key words interleukin-2, lymphokine activated killer cell, antigen-specific cytotoxic T lymphocyte, tumor-infiltrating lymphocyte, adoptive immunotherapy

癌患者の免疫能は一般に低下しているが，肺癌患者では他臓器癌に比べて，一層著明である．このように低下している肺癌患者の免疫的反応を，いわゆる生物学的応答修飾物質 (biological response modifier, BRM) を用いて賦活し，その生存率を向上させようとする非特異的免疫療法の臨床試行が多くなされてきた．教室でも溶連菌製剤，OK-432 を用いての臨床比較試験がなされ，その有効性を報告してきた[1)-5)]．

Abbreviations: AIT, adoptive immunotherapy; ANOVA, analysis of variance; AT, autologous tumor; BAI, bronchial artery infusion; BCG, Bacillus-Calmette-Guérin; BRM, biological response modifier; CD, Cluster of Differentiation; CML, cell-mediate

このような非特異的免疫療法に対し，癌患者自身の末梢血リンパ球を一旦体外に取り出し，リコンビナント インターロイキン－2 (recombinant interleukin-2, rIL-2) とともに長期間培養し，リンホカイン賦活化キラー (lymphokine activated killer, LAK) 細胞を誘導し，これを再び大量の rIL-2 とともに患者の静脈に戻し，LAK 細胞による抗腫瘍性を期待し，治療を行なう，いわゆる養子免疫療法 (adoptive immunotherapy, AIT) が，Rosenberg ら[6)7)]によって創始され，その臨床応用がなされてきた．しかし，このような全身投与による養子免疫療法には種々の副作用が生じることが明らかにされ，その奏効率も必ずしも高率ではないことが明らかにされている．教室では種々の基礎実験の後，養子免疫療法の臨床応用として，LAK 細胞の肺癌患者の気管支動脈内注入による局所的養子免疫療法を行なってきた[4)8)9)]．

一方，このような末梢血リンパ球を用いての養子免疫療法に対し，腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocyte, TIL) を用いて培養・誘導される TIL-LAK 細胞のもつ細胞傷害活性が，末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocyte, PBL) から培養・誘導される PBL-LAK 細胞より高いことが知られ，種々の癌に対し，一部臨床応用が開始され，その臨床効果がより優れていることも報告されている[10)]．

本論文では，TIL による LAK 細胞の誘導およびその免疫的機能に関する基礎的研究を中心とし，さらに TIL-LAK 細胞による養子免疫療法の臨床応用の予備研究として，少数例の癌性胸膜炎の治療について検討した．すなわち，手術材料から採取した肺癌組織から TIL を抽出し，その細胞傷害活性を PBL，所属リンパ節リンパ球 (regional lymph node lymphocyte, RLNL) と比較し，同時にそれらの表面マーカーを検討した．さらに TIL のシミュレーションとして PBL を用いて，リンパ球を試験管内で混合培養することにより，標的細胞傷害を有する T 細胞を誘導し，それと比較して TIL の性格づけを行なう一助とした．また，癌性胸膜炎患者の胸水から抽出した TIL を用いての AIT を行なった．

対象および方法

I．対　象

1989年10月より1990年7月までに金沢大学第一外科に入院し，病理組織学的に肺癌と確定診断された症例のうち46例を対象とし，その末梢血，局所リンパ節および腫瘍組織を用いた．症例の内訳は，男性27例，女性9例で，年令は45～80歳 (平均68.4歳) であった．病理組織型は，扁平上皮癌16例，腺癌16例，腺扁平上皮癌1例，大細胞癌2例，小細胞癌1例であった．病期分類は，肺癌取扱い規約 (1987)[11)]による TNM 分類によった．その他，対照として健康成人8名の末梢血を使って検索を行なった．

II．リンパ球の分離と浮遊液の調整

1．PBL あるいは胸水中の TIL

単核球の分離は Ficoll-Hypaque 比重遠心法により行なった．早朝空腹時に採取したヘパリン加末梢血10～20ml を，0.1M リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) (phosphate buffered saline, PBS) で2倍に希釈し，Ficoll-Hypaque 液 (比重1.077) (Lymphoprep) (Nyegaad, Oslo, Norway) 上に静かに重層させ，400×g で20分間遠心後，中間層を採取し，ペニシリン 200U/ml，ゲンタマイシン 10μg/ml を添加した RPMI-1640 液 (Gibco, Gran Island, New York, USA) で3回洗浄し，単核球を分離した．次いで直径6 cm のプラスチックシャーレ (Falcon, Oxnard, California, USA) に RPMI-1640 液をうすく敷き，その上に単核球浮遊液を散布し，37°C，5% CO_2下で1時間静置後，上清液を採取してプラスチック付着細胞を除去した．非付着細胞浮遊液を 200×g で5分間遠心した後，その沈渣を非動化した牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (Gibco) を 10% 濃度に加えた RPMI-1640 液に浮遊させた．

2．領域リンパ節リンパ球 (regional lymph node lymphocyte, RLNL)

術中採取した局所リンパ節を PBS 中で眼科用ハサミで細切し，金属メッシュ (NBC 工業，大阪) で濾過した後，Ficoll-Hypaque 比重遠心法によって単核球を分離し，PBL と同様の方法によりプラスチック非付着細胞を集め，これを RLNL とした．各リンパ節の一部から病理組織標本を作成し，転移の有無を検索した．

3．TIL および自家腫瘍 (autologous tumor, AT)

術中切除した肺癌組織より採取した標本から健常組織，壊死組織を除去し，PBS で2回洗浄した．

---

lymphocyte; CTL, cytotoxic T lymphocyte; FCS, fetal calf serum; HLA, human leukocyte antigen; HBSS, Hanks' balanced salt solution; IL-2, interleukin-2; LAK, lymphokine activated killer; MAF, macrophage activating factor; MLC, mixed

Vose[12]の方法に基づいて，0.01%ヒアルロニダーゼ (hyaluronidase Type I-S, Sigma, St. Louis, USA), 0.25%コラゲナーゼ (collagenase Type I-A, Sigma), 0.1%デオキシリボヌクレアーゼ (deoxyribonuclease Type I, Sigma) を添加した RPMI-1640 液中で標本を眼科用ハサミで細切し，金属メッシュで濾過した．ついで細胞浮遊液に0.25%トリプシン (trypsin, Sigma) を 10～20ml を添加した PBS に浮遊させ，マグネチックスターラーにて15分間攪拌した．上清を2枚重ねのガーゼで2回濾過し，Hanks 液 (Hanks' balanced salt solution, HBSS) で2回洗浄した後，その沈渣を非動化した 10% FCS 添加 RPMI-1640 液に浮遊させた．次いで直径 6cm のプラスチックシャーレに RPMI-1640 液をうすく 1ml 程敷き，細胞浮遊液を加え，37°C，5% CO_2下で1時間静置後，上清液を採取してプラスチック付着細胞を除去した．次に 10% FCS 添加 RPMI-1640 液を用いて，25%, 15%, 10% Percoll (Sigma) を作製し，それぞれ2.5ml づつ重層し，室温，25×g で7分間遠心後，上層，下層をそれぞれ採取し，HBSS にて2回洗浄した．上層より TIL を，下層より AT を得た．

Ⅲ．細胞傷害活性の測定

試験管内で K562 細胞 (継代培養したヒト赤白血病細胞由来の細胞株) を標的細胞 (target cell) として用いてナチュラルキラー (natural killer, NK) 活性を，同様に Daudi 細胞 (ヒトバーキットリンパ腫由来の細胞株) を用いて LAK 活性を ^{51}Cr 遊離試験にて測定した．その他，AT，アロジェニック細胞 (allogenic cell, 特定個人のブラスト化されたリンパ球) 等を標的細胞として用いる場合も同様にした．まず，リンパ球を 10% FCS 添加 RPMI-1640 液で 4×10^6cells/ml に調整し，その 100μl を96穴平底型マイクロプレート (Falcon) の穴に分注し，作働細胞 (effector cell) とした．一方，2×10^6cells/ml 濃度の標的細胞浮遊液 1ml に 200μCi の $Na_2{}^{51}CrO_4$ (200μl) (New England Nuclear, Boston, Massachusetts, USA) を加え，37°C，5% CO_2下で1時間インキュベートした後，RPMI-1640 液で3回洗浄し，10% FCS 添加 RPMI-1640 液に浮遊させたものを ^{51}Cr 標識標的細胞浮遊液とした．次いで，1×10^5cells/ml 濃度に調整した ^{51}Cr 標識標的細胞浮遊液 100μl を先の作働細胞液 100μl に加えた (この条件で作働細胞と標的細胞は 40：1 の数比となる)．37°C，5% CO_2下で4時間インキュベートした後，上清を各穴から 100μl 宛採取し，上清中の ^{51}Cr 放出量をオートウェルガンマーカウンター ARC 501 (アロカ，東京) にて測定した．下記の計算式に基づき特異的 ^{51}Cr 放出値を算出して，これを細胞傷害活性値とした．

$$\text{細胞傷害活性(\%)}=\frac{^{51}\text{Cr 実測値}-{}^{51}\text{Cr 自然放出量}}{^{51}\text{Cr 最大放出量}-{}^{51}\text{Cr 自然放出量}}\times100$$

最大放出量は標的細胞に0.1N 塩酸 100μl を加えた時の^{51}Cr 放出量を示し，自然放出量は 10% FCS 添加 RPMI-1640 液 100μl を加えて4時間インキュベートした後の標的細胞^{51}Cr 放出量である．

Ⅳ．rIL-2 または OK-432 の添加培養による細胞傷害活性の測定

4×10^6cells/ml 濃度のリンパ球浮遊液 0.4ml に 20U/ml 濃度の rIL-2 (塩野義製薬，大阪) 0.6ml または 5KE/ml 濃度の OK-432 (中外製薬，東京) 0.1ml (＋RPMI-1640 液0.5ml) を添加し，37°C，5% CO_2下で5日間培養した．K562 細胞，Daudi 細胞，AT を標的細胞とし，培養リンパ球による細胞傷害活性を測定した．また，同時に患者 PBL を 1μg/ml 濃度のフィトヘマグルチニン (phytohemagglutinin, PHA) (PHA-P) (Difco, Detroit, Michigan, USA) 存在下で3日間培養し，ブラスト化させ，標的細胞として用い，細胞傷害活性を測定した．

Ⅴ．TIL のシミュレーション

リンパ球混合培養試験により誘導される作働細胞を TIL のシミュレーションとして作製した．健常人の PBL (研究者自身の PBL) を 0.1mg/ml 濃度のマイトマイシン C (協和発酵，東京) を添加した 10% FCS 添加 RPMI-1640 液中，37°C，5% CO_2下で30分間培養した．それを RPMI-1640 液にて5回洗浄し，刺激細胞とした．この健常人 PBL を患者 PBL と 1：1 となるように混合し，10% FCS 添加 RPMI-1640 液中，37°C，5% CO_2下で10日間培養した．健常人 PBL を癌細胞，患者 PBL を TIL と想定した．培養5日目に培養液を交換した．さらに10日目に培養液を 20U/ml 濃度の rIL-2 存在下の 10% FCS 添加 RPMI-1640 液に換えて，37°C，5% CO_2下で5日間培養した．また，誘導された特異的細胞傷害活性をもつ T 細胞の活性を測定するために，同時に健常人の PBL を 1μg/ml 濃

lymphocyte culture; NK, natural killer; PBL, peripheral blood lymphocyte; PBS, phosphate buffered saline; rIL-2, recombinant interleukin-2; PHA, phytohemagglutinin; RLNL, regional lymph node lymphocyte; TIL, tumor-infiltrating lymphocyte

度の PHA 存在下で3日間培養し，ブラスト化させた．上記のごとく，15日間培養した患者 PBL を作働細胞として，アロジェニック標的細胞 (allogenic target cell), Daudi 細胞，K562 細胞に対する細胞傷害活性を測定した．また，対照として，10名の患者 PBL を，混合培養を行わずに上記と同様15日間培養して，アロジェニック標的細胞，Daudi 細胞，K562 細胞に対する細胞傷害活性を測定した．

VI．モノクローナル抗体によるリンパ球亜群の分類

肺癌患者の腫瘍組織より分離したリンパ球分画中のリンパ球亜分画をヒトリンパ球に対する各種モノクローナル抗体を用い検討した．3〜5×10⁶cells/ml に濃度調整したリンパ球浮遊液 100μl にモノクローナル抗体 10μl を加え，4℃，30分間静置した．これに PBS 1ml を加え，レーザーフローサイトメーター SpectrumIII (Ortho Diagnostic system, Raritan, New Jersey, USA) によって蛍光陽性細胞を測定した．使用モノクローナル抗体は，すべて市販で蛍光標識されたものであり，末梢血 T 細胞に特異的な分化群 (Cluster of Differentiation, CD) 3, CD2, CD5，ヘルパー/インデューサー T 細胞に特異的な CD4，サプレッサー/細胞傷害性 T 細胞に特異的な CD8 (Ortho Diagnostic system), NK 細胞 (natural killer cell) に特異的な CD57 (LEU7), CD19, NK 細胞及び好中球に特異的な CD16 (LEU11), B 細胞に特異的な CD20 (LEU16), B 細胞，単球，マクロファージ及び活性化 T 細胞に特異的なヒトリンパ球抗原－DR (human leukocyte antigen-DR, HLA-DR) (Becton Dickinson, Mountain View, California, USA), NK 細胞に特異的な NKH-1 (Coulter,Hialeah, Florida, USA) に対する抗体を用いた．

VII．LAK 細胞の大量誘導

1．PBL の分離

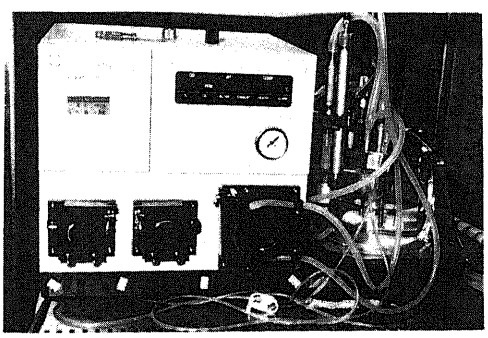

Fig. 1. Automated high density cell culture system (SHC-1).

ブラッドセルセパレーター IBM 2997 (日本アイビーエム，東京) を用いて肺癌患者より白血球分画を採取し，さらに Ficoll-Hypaque 比重遠心法により，PBL を分離した．

2．TIL の分離

癌性胸膜炎を併発した肺癌患者より，胸水を採取し，Ficoll-Hypaque 比重遠心法により，TIL を分離した．

3．高密度自動細胞培養システム

今回の研究で使用した高密度自動細胞培養システムは，島津高密度細胞培養装置 SHC-1 (島津製作所，京都) である (図1). SHC-1 は培養槽内でスターラーを回転させる構造であり，培養液の交換が自動的に行なわれる．培養液中の pH，溶存酸素，温度などは随時モニターされ，終始一定の培養条件に保たれる．この培養装置を用いて，先に分離したリンパ球を 1000U/ml の rIL-2 と共に培養した．

4．LAK 細胞の回収

培養後1〜2週目に培養槽を PBS で洗浄し，細胞を回収した．回収された LAK 細胞は，細胞数，細胞傷害活性，細胞表現マーカー (phenotype) などを測定した．

VIII．養子免疫療法 (AIT)

上記の方法により大量に誘導・回収された LAK 細胞は，胸腔内ドレーンより患者胸腔内に注入した．

IX．測定値の有意差検定

細胞傷害活性の測定値は，平均値±標準偏差 (mean±S.D.) をもって示した．対応のある場合の有意差検定には，t 検定を用い，多群間の有意差検定には，分散分析後，Scheffé の多重比較法を用い，危険率 5% 以下を有意差ありとした．

成　　績

I．肺癌患者リンパ球の NK 活性の変動

^{51}Cr 放出度を指標とした肺癌患者7例の PBL の NK 活性は30.5±9.9%であり，20%以上の活性を示すのに反し，転移を認めない9標本の RLNL の NK 活性は14.0±7.2%，肺癌患者22例の TIL の NK 活性は14.7±5.8%であり，PBL と比較して有意に ($p<0.05$) 低かった (図2a). また，Daudi 細胞にたいする細胞傷害活性は，肺癌患者6例の PBL で19.5±8.2%，転移を認めない8標本の RLNL で13.8±8.8%，肺癌患者21例の TIL で12.8±5.7%であり，いずれも20%以下の活性値であった (図2b).

II．OK-432,rIL-2 添加培養による TIL の細胞傷害活性の増強

OK-432,rIL-2 を添加して5日間培養した肺癌患者22人の TIL につき，K562 細胞，Daudi 細胞，AT に対する傷害活性を測定した．K562 細胞に対する活性(NK-LAK 活性，あるいは，単に NK 活性)は，無添加群14.7±5.8%，OK-432 添加群28.5±14.1%，rIL-2 添加群32.6±14.7%であり，無添加群と比較して OK-432 添加群，rIL-2 添加群で有意に ($p<0.05$) 傷害活性の増強が認められた (図3a). Daudi 細胞に対する活性 (LAK 活性) は，無添加群12.8±5.7%，OK-432 添加群31.1±14.1%，rIL-2 添加群33.7±12.3%であり，無添加群と比較して OK-432 添加群，rIL-2 添加群で有意に ($p<0.05$) 傷害活性の増強が認められた (図3b). AT に対する活性は，無添加群4.4±3.5%，OK-432 添加群16.7±7.0%，rIL-2 添加群21.5±7.3%であり，無添加群と比較して OK-432 添加群，rIL-2 添加群で有意に ($p<0.05$) 傷害活性の増強が認められた (図3c).

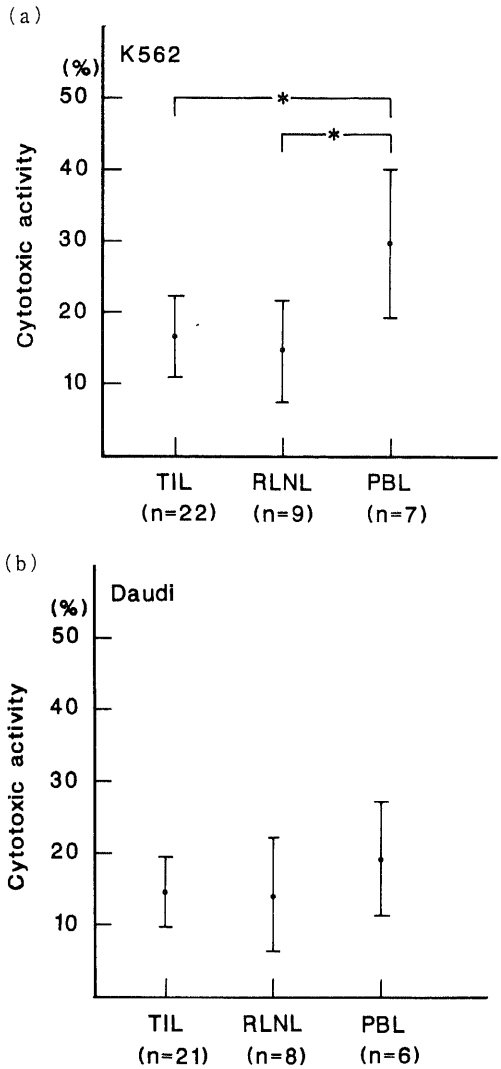

Fig. 2. Cytotoxic activity of lymphocytes before culture. (a) NK activity of PBL, RLNL, and TIL in patients with lung cancer. (b) cytotoxic activity against Daudi cells PBL, RLNL, and TIL in patients with lung cancer. PBL, RLNL, and TIL were tested for lysis of K562 cells in ^{51}Cr specific release assay. 100%: experimental release=maximal release. Data are shown as mean±S.D.. *, $p<0.05$ by ANOVA (analysis of variance) with Scheffé's multiple comparison.

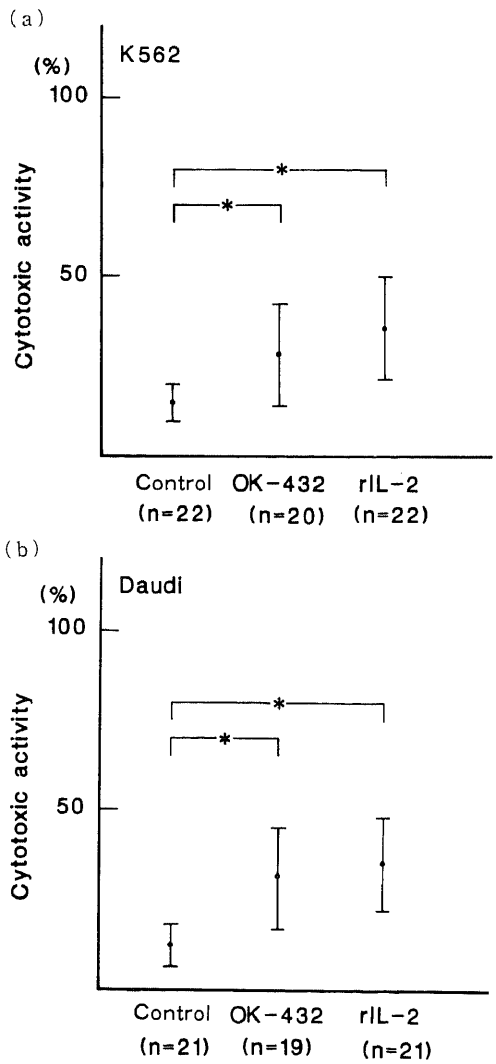

Fig. 3.

対照として，PHA を添加して3日間培養して幼若化させた患者自身の PBL (PHA ブラスト) (PHA-blastogenesis, PHA-blast) に対する TIL の細胞傷害活性を測定した．PHA ブラストに対する活性は，無添加群2.1±2.0%，OK-432 添加群2.0±1.2%，rIL-2 添加群4.0±6.0%であり，細胞傷害活性はほとんどないものと考えられた (図3d).

また，転移を認めない5標本の RLNL と7人の肺癌患者の PBL に rIL-2 を添加して5日間培養し，NK-LAK 活性，LAK 活性，AT に対する活性を測定した．rIL-2 添加群の K562 を標的細胞とした NK-LAK 活性は，RLNL では47.0±6.5%で，TIL の34.1±14.7%に比べて高値であったが，有意差はなかった．しかし，PBLの NK-LAK 活性は54.2±9.4%で，TIL のそれと比較して，有意に ($p<0.05$) 高値を示した (図4a). Daudi を標的細胞とした LAK 活性は，RLNL では53.2±13.9%，PBL では54.7±16.1%であり，TIL の35.2±12.3%と比較して，有意に ($p<0.05$) 高値を示した (図4b). AT に対する活性は，RLNL では31.6±2.8%，PBL では33.2±4.2%であり，TIL の21.5±7.3%と比較して，有意に (p<

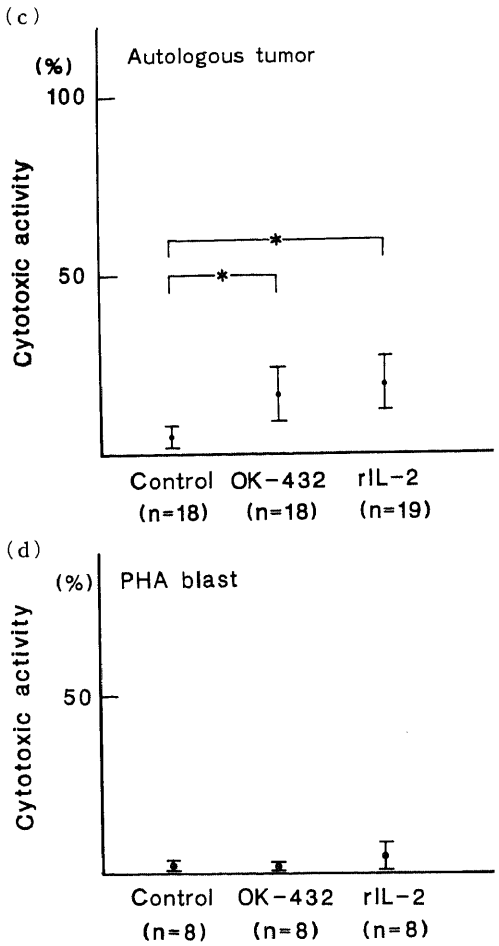

Fig. 3. Augmentation of cytotoxic activity of TIL in patients with lung cancer by OK432 or rIL-2 simulation in vitro. TIL (1.6×10^6 cells/ml) were cultured in RPMI-1640 supplement with 10% FCS and OK432 or rIL-2, and tested for lysis of K562 cells (a), Daudi cells (b), autologous tumor (c) and autologous PHA blast (d) at 5 days of culture period. Tests were performed in ^{51}Cr specific release assay. 100%: experimental release=maximal release. Data are shown as mean±S.D.. *, $p<0.05$ by ANOVA with Scheffé's multiple comparison.

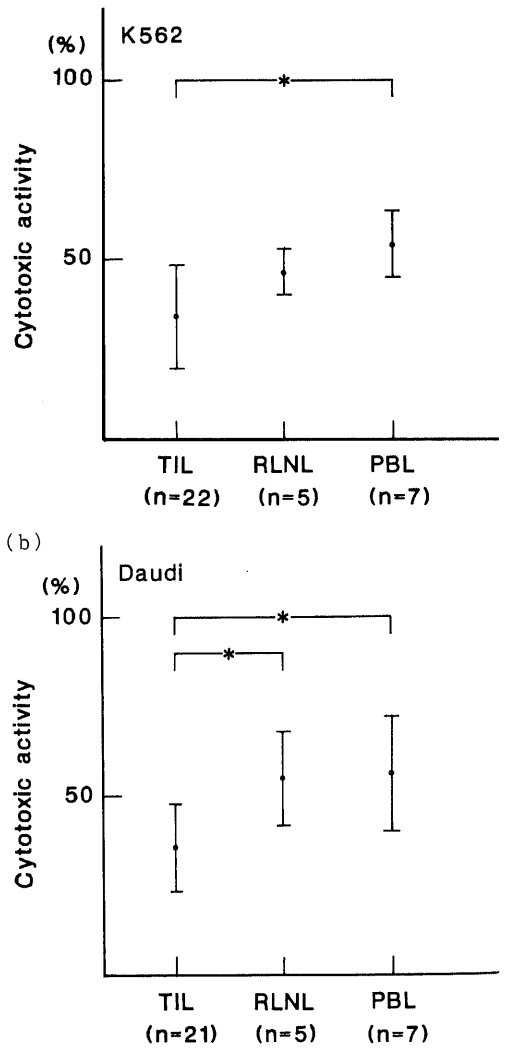

Fig. 4.

0.05) 高値を示した (図4c).

III. 病期別の TIL の細胞傷害活性の変動

rIL-2 を添加して 5 日間培養した TIL の細胞傷害活性を測定して，病期別に分類した．肺癌取扱い規約 (1987) にしたがって，病期分類を行なった．NK 活性は，I 期，46.0±11.0%，II 期，42.6±13.6%，III 期，31.0±14.8%，IV期，26.2±4.3%であり，病期が進むにしたがって低下する傾向を認めたが，いづれの間にも有意差を認めなかった (図5a). LAK 活性は，I 期，46.6±12.1%，II 期，39.2±8.8%，III期，33.5±12.4%，IV期，27.7±1.6%であり，病期が進むにしたがって低下する傾向を認めたが，いづれの間にも有意差を認めなかった (図5b). AT に対する細胞傷害活性は，I 期，27.6±7.7%，II 期，24.3±6.4%，III期，19.1±5.7%，IV期，16.6±2.0%であり，病期が進むにしたがって低下する傾向を認めたが，いづれの間にも有意差を認めなかった (図5c).

IV, TIL のシミュレーション

マイトマイシン処理した健常人の PBL を刺激細胞として患者 PBL を10日間混合培養し，さらに 5 日間

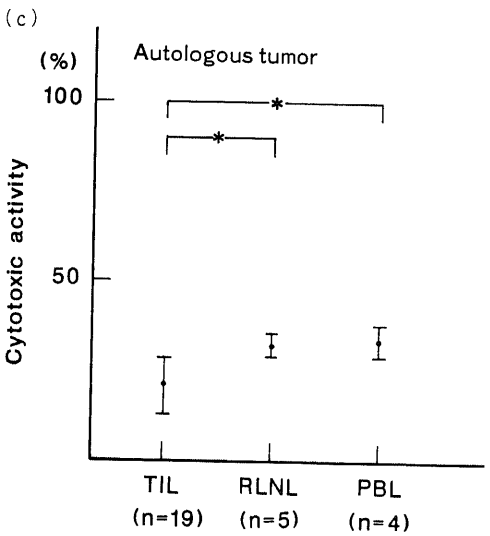

Fig. 4. Augmentation of cytotoxic activity of TIL, RLNL and PBL in patients with lung cancer by OK432 or rIL-2 simulation in vitro. Lymphocytes (1.6×10^6 cells/ml) were cultured in RPMI-1640 supplement with 10% FCS and rIL-2, and tested for lysis of K562 cells (a), Daudi cells (b) and autologous tumor (c) at 5 days of culture period. Tests were performed in ^{51}Cr specific release assay. 100%: experimental release=maximal release. Data are shown as mean±S.D.. *, $p<0.05$ by ANOVA with Scheffé's multiple comparison.

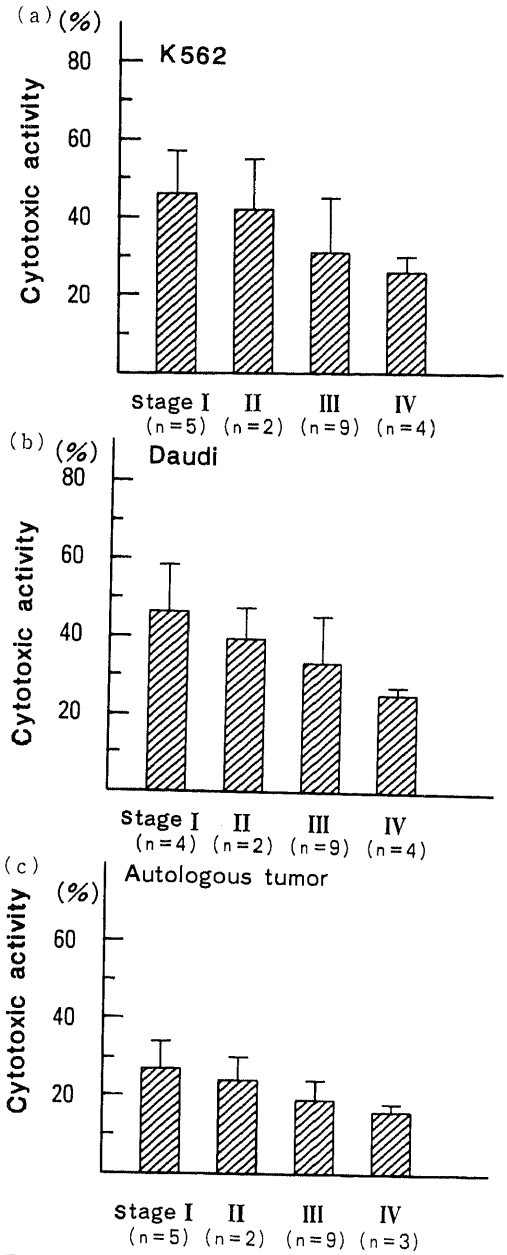

Fig. 5. Augmentation of cytotoxic activity of TIL in patients with lung cancer in various stages by rIL-2 simulation in vitro. Lymphocytes (1.6×10^6 cells/ ml) were cultured in RPMI-1640 supplement with 10% FCS and rIL-2, and tested for lysis of K562 cells (a), Daudi cells (b) and autologous tumor (c) at 5 days of culture period. Tests were performed in ^{51}Cr specific release assay. 100%: experimental release=maximal release. Data are shown as mean±S.D.. *, $p<0.05$ by ANOVA with Scheffé's multiple comparison.

rIL-2 を添加して培養した．患者 PBL をアロジェニック作働細胞 (allogenic effector cell) として，NK 活性，LAK 活性，細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 活性を測定した．CTL 活性は PHA を添加して3日間培養した特定個人 PBL (アロジェニック標的細胞) に対する細胞傷害活性を測定した．NK 活性は，健康成人43.4±13.2%，I期，33.2±4.1%，II期，31.2±0.5%，III期，25.8±12.7%，IV期，22.7±7.9%であり，病期が進むにしたがって低下する傾向を認めたが，いづれの間にも有意差を認めなかった (図6a). LAK 活性は，健康成人56.1±17.3%，I期，42.0±9.5%，II期，38.0±6.5%，III期，29.7±12.0%，IV期，21.0±5.1%であり，病期が進むにしたがって低下する傾向を認め，健康成人とIII期，IV期に有意差 ($p<0.05$) を認めた (図6b). アロジェニック標的細胞に対する CTL 活性は，健康成人35.6±12.0%，I期，28.2±14.1%，II期，20.5±5.7%，III期，16.1±3.8%，IV期，9.9±3.6%であり，病期が進むにしたがって低下する傾向を認め，健康成人とIII期，IV期に有意差 ($p<0.05$) を認めた (図6c). また，対照として混合培養を行なわなかった患者 PBL のアロジェニック標的細胞に対する CTL 活性は6.1±7.4%であったが，混合培養を行なうことによって25.2±14.8%と有意に CTL 活性の上昇を認めた (図7). しかし，NK 活性，LAK 活性は混合培養によって，有意差はないものの，やや低下した．

また，アロジェニック標的細胞に対する CTL 活性と NK 活性の相関関係は，相関係数0.487の弱い順相関を示した (図8a). アロジェニック標的細胞に対する CTL 活性と LAK 活性は相関係数0.758の強い順相関を示した (図8b). LAK 活性と NK 活性は相関係数0.646の弱い順相関を示した (図8c).

V. TIL の表現型 (phenotype) の推移 (図9)

各種モノクローナル抗体に陽性を示すリンパ球亜群

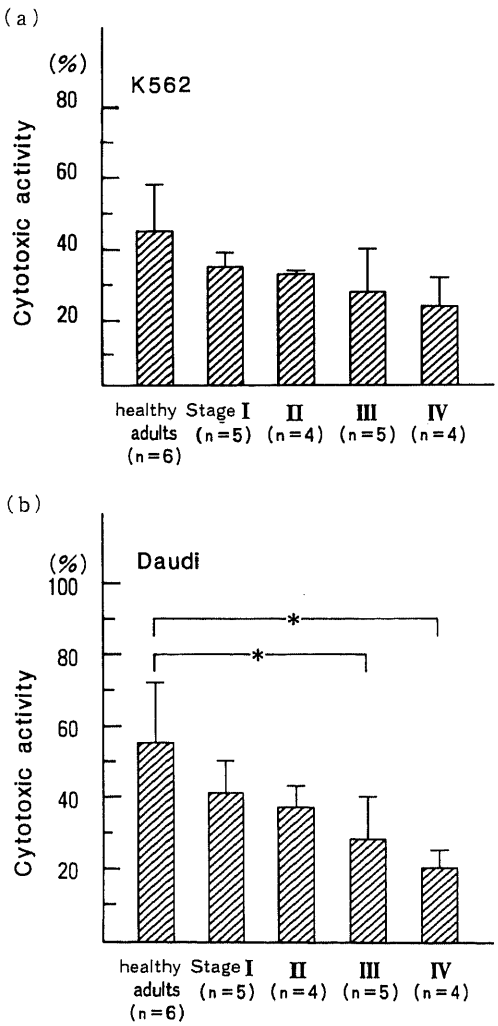

Fig. 6.

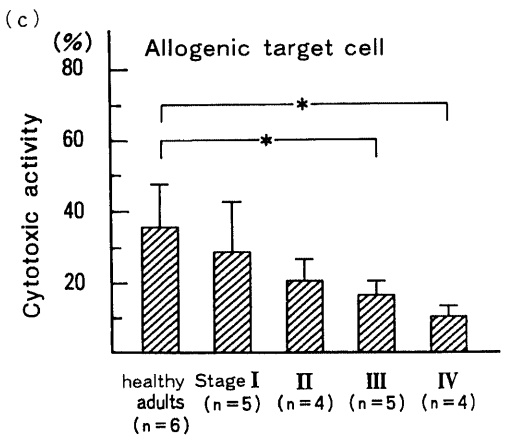

Fig. 6. Augumentation of cytotoxic activity of PBL in patients with lung cancer, which were cultured for 10 days with allogenic lymphocytes inactivated by mitomicin C, in various stages by rIL-2 simulation in vitro. Lymphocytes (1.6×10^6 cells/ml) were cultured in RPMI-1640 supplement with 10% FCS and rIL-2, and tested for lysis of K562 cells (a), Daudi cells (b) and allogenic target lymphocytes (c) at 5 days of culture period. Tests were performed in ^{51}Cr specific release assay. 100%: experimental release=maximal release. Data are shown as mean±S.D.. *, $p<0.05$ by ANOVA with Scheffé's multiple comparison.

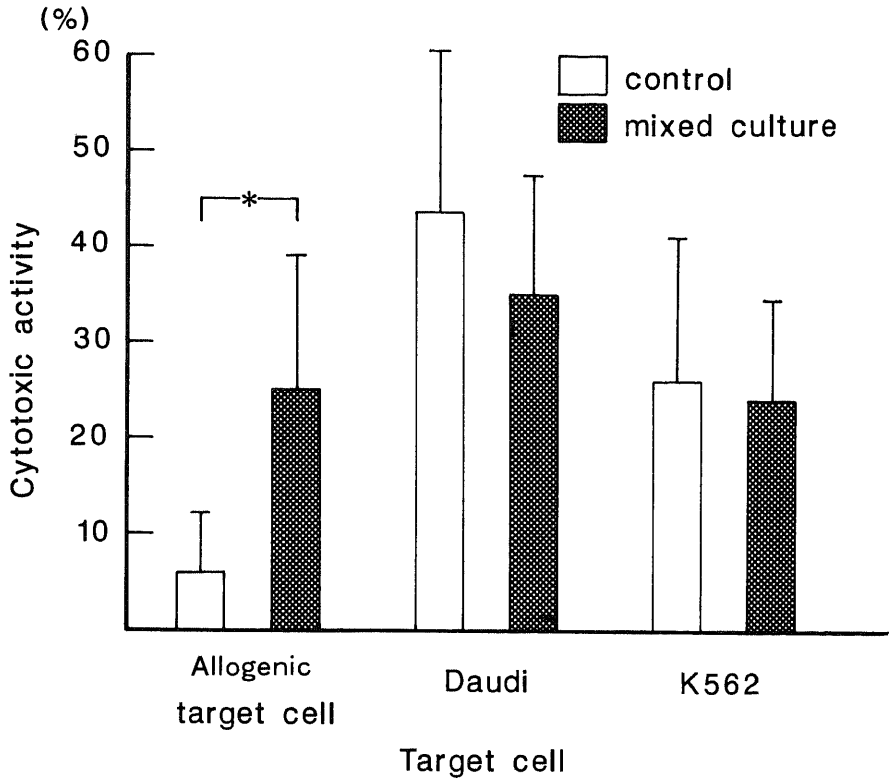

Fig. 7. Cytotoxicity of lymphocytes after mixed lymphocyte culture. Control: effector cells were PBL cultured for 10 days without allogenic lymphocytes and enhanced by rIL-2 for 5 days. Mixed culture: effector cells were PBL cultured for 10 days with allogenic lymphocytes and enhanced by rIL-2 for 5 days. Effector cells were tested for lysis of K562 cells, Daudi cells and allogenic target lymphocytes. Tests were performed in ^{51}Cr specific release assay. 100%: experimental release=maximal release. Data are shown as mean±S.D.. *, $p<0.05$ by paired t test.

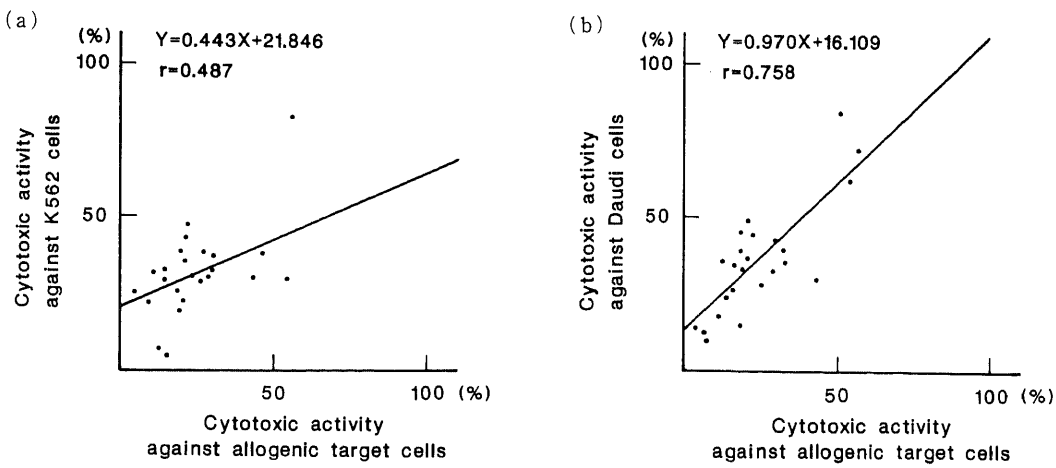

Fig. 8.

の割合を，培養前と培養後の TIL について比較した．CD3 陽性細胞，CD4 陽性細胞，CD8 陽性細胞，CD57 陽性細胞，CD2 陽性細胞，HLA-DR 陽性細胞，NKH-1 陽性細胞が培養後増加したが，CD8 陽性細胞にのみ有意差を認めた ($p<0.05$). CD16 陽性細胞，CD20 陽性細胞は減少したが，有意の減少ではなかった．また，CD4 陽性細胞/CD8 陽性細胞は1.69±0.69から0.86±0.54に低下したが，有意差はなかった．

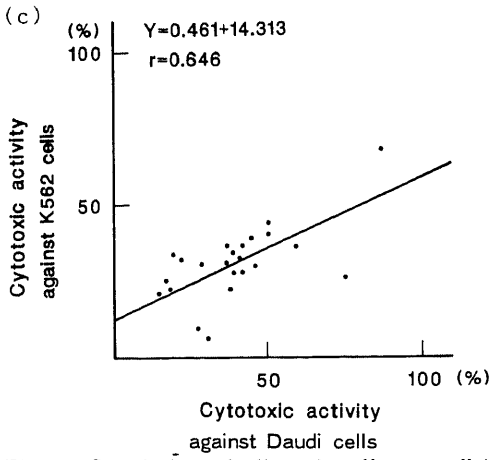

Fig. 8. Correlation of allogenic effector cells' cytotoxicity against K562 cells and allogenic target cells (a).
Correlation of allogenic effector cells' cytotoxicity against Daudi cells and allogenic target cells (b).
Correlation of allogenic effector cells' cytotoxicity against of K562 cells and Daudi cells (c).
100%: experimantal release=maximal release.

VI. LAK の胸腔内注入による養子免疫療法

SHC-1 を使用して回収された LAK 細胞を胸腔内注入により，患者自身に戻す養子免疫療法を 3 例の癌性胸膜炎を合併した肺癌患者に計 4 回施行した．3 例中 2 例で胸水の消失を認めた (表1).

考 察

AIT は Rosenberg らによって PBL-LAK の全身投与として臨床応用された[6)7)]．その後，多くの施設で，基礎的並びに臨床的研究が重ねられ，有効な LAK 細胞の誘導，培養法，その細胞傷害活性増強法，AIT の投与経路などについて種々の検討がなされてきた．しかし，臨床効果を発揮するのに必要な LAK 細胞数，LAK 細胞の増殖法，rIL-2 の大量投与による毛細血管透過性漏洩症候群 (capillary permeability leak symdrome) に対する対策など未だ未解決の諸問題を残している．肺癌に対する AIT 療法は，未だその緒についたばかりであり，その報告も少ないが，他臓器癌での AIT の問題点を考慮して，教室をはじめ気管支動脈内投与 (bronchial artery infusion, BAI) の報告が多い[4)9)14)15)]．また，教室の吉田[16)]，木村ら[14)15)]は，腫瘍細胞に接触，刺激させた LAK 細胞 (stimulated-LAK 細胞) の細胞傷害活性が極めて高いことを報告している．このような PBL-LAK による AIT の他

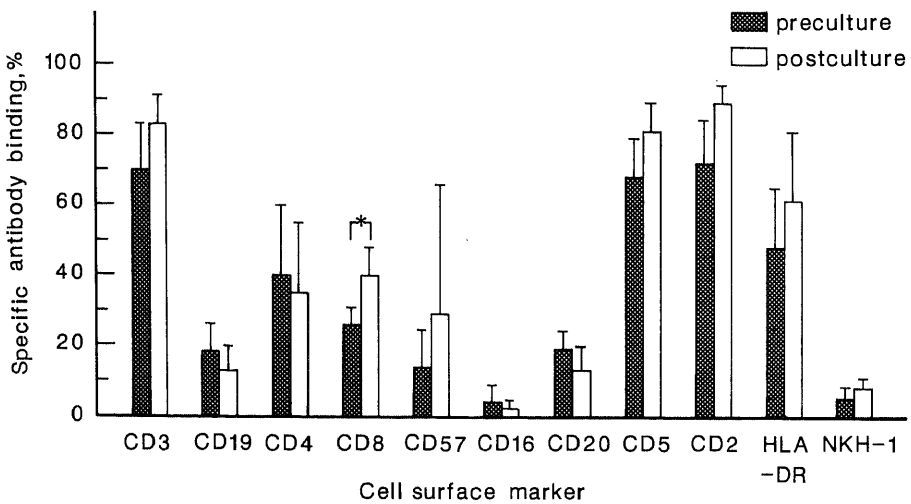

Fig. 9. Augmentation of cell markers of TIL and 5-day-cultured TIL. Used cell markers were CD3, CD19, CD4, CD8, CD57, CD16, CD20, CD5, CD2, HLA-DR and NKH-1. Data are shown as mean±S.D.. *, $p<0.05$ by paired t test.

Table 1. Effect of local adoptive immunotherapy through intrathoracic infusion.

case	histology	infused LAK cell	cytotoxicity (%)	CD3 (%)	CD4/CD8	pleural effusion
1. 63♂	adeno-carcinoma	TIL 3.8×10^8	NK 14.8 LAK 26.8 AT 15.6	92	1.1	no change
the same above	adeno-carcinoma	PBL 6.6×10^8	NK 13.2 LAK 26.1 AT 9.5	82	1.0	no change
2. 55♂	adeno-carcinoma	TIL 2.0×10^8	not tested	89	1.9	disappeared
3. 54♂	adeno-carcinoma	TIL 2.0×10^8	NK 5.2 LAK 12.5	90	0.04	disappeared

NK, Natural killer cell activity assayed by cytotoxic activity against K562 cells; LAK, Lymphokine activated killer cell activity assayed by cytotoxic activity against Daudi cells; AT, cytotoxic activity assayed against autologous tumor cells.

に，TIL から誘導される TIL-LAK 細胞の抗腫瘍性が最近注目され，一部臨床応用されている．Rosenberg ら[10]は微小転移を有するマウスに IL-2 を添加して培養した TIL の移入療法を行い，末梢血由来の LAK 細胞と比較して50倍から100倍の治療効果を示したと報告している．TIL は PBL と比べると NK 活性が非常に低く，免疫監視機能が抑制されているものと考えられるが[17]，rIL-2 を全身投与すると，NK 活性は上昇する[18]．著者の研究においても，TIL の NK 活性は RLNL とともに，20%以下であり，なんらかの免疫抑制を受けていることが示唆された．また，森ら[19]は口腔癌より分離した TIL に rIL-2 を添加して培養し，NK 活性，LAK 活性を測定したところ，PBL よりも高い活性を示す症例も認めたと報告している．しかし，Pisani ら[20]は，IL-2 を添加して培養した TIL の K562 細胞，M14 細胞，自家腫瘍細胞，アロジェニック腫瘍 (allogenic tumor) に対する細胞傷害活性は PBL-LAK 細胞と比較して低値であったと報告している．K562 細胞を使って NK 活性を，Daudi 細胞を使って LAK 活性を測定[21]したところで，著者の研究では肺癌 TIL の NK 活性は PBL に比べて有意に低く，また，rIL-2 を添加して培養した TIL の K562 細胞，Daudi 細胞，自家腫瘍細胞に対する細胞傷害活性は，PBL-LAK 細胞と比較して有意に低いとの結果を得た．

健康人では腫瘍細胞が出現すると NK 細胞，抗原特異性 CTL などの細胞免疫機能が賦活化されるが，癌患者では腫瘍細胞が増殖するにしたがい，免疫防御機能は抑制される．それ故，癌患者では進行性の T 細胞不全が生じており，末梢血 T 細胞の種々の機能も抑制状態にある．これら免疫抑制の原因としては，担癌生体におけるサプレッサー細胞の出現[22][23]，流血中の可溶性免疫複合体 (soluble immune complex)[24]やマクロファージの産生するプロスタグランジンなどの抑制因子[25][26]の存在，低栄養状態[27]，癌細胞によって産生される免疫抑制物質の作用が考えられる．サイトカインの面からは T 細胞の IL-2 産生能の低下，インターロイキン－2 (interleukin-2, IL-2) レセプターの発現，マクロファージ賦活化因子 (macrophage activating factor, MAF) の産生能の低下などが観察されている[28]．癌巣内でも同様の T 細胞不全が生じているものと考えられる．Niitsuma, Holmes ら[29][30]によって癌巣内に Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) を局所注射することによって混合リンパ球培養 (mixed lymphocyte culture, MLC)，細胞媒介性リンパ球溶解 (cell-mediated lympholysis, CML)，NK 活性が回復するが，BCG の全身投与では効果がないと報告されており，腫瘍内の免疫抑制因子の存在を示唆している．また，IL-2 を全身投与することによって，TIL の腫瘍傷害活性を回復させることができる[34]．これらのことか

ら，癌局所における免疫抑制は可逆性であり，免疫抑制を起こす環境を取り除けば，TIL の抗腫瘍効果を有効に引き出すことができる可能性を示唆している．

TIL の浸潤の程度と患者の予後とは関連があり，TIL は腫瘍免疫反応の一つとして諸家の関心を集めてきた[31]．肺癌においても T 因子，N 因子の進行に伴って，腫瘍細胞密度が増加し，TIL 密度が低下する傾向が認められると報告されている[32]．著者の研究においても病期が進行するにつれて，NK 活性，LAK 活性，AT に対する細胞傷害活性は 3 者とも低下する傾向を認めた．さらに，TIL から IL-2 によって誘導される作働細胞は増殖パターンや細胞傷害活性が PBL と異なった特徴を示すことが知られている[33]．

TIL の大部分は CD4 陽性のインデューサー T 細胞亜群あるいは CD8 陽性のキラー・サプレッサー T 細胞亜群で，これらが種々の程度に混在している．肺癌を含むヒト腫瘍系で CD8 陽性 T 細胞優位であるといわれるが[34]，肺癌では CD4 陽性 T 細胞が優位であるという報告もある[35][36]．また，腫瘍内には B 細胞やマクロファージ，さらには NK 細胞のマーカーをもつものは少数である．マクロファージに関しては抗腫瘍性があるとするもの，ないとする報告に大別される[37]~[39]．著者の実験でも TIL は T 細胞が大多数をしめ，B 細胞，マクロファージ，NK 細胞は少数であった．また，T 細胞の腫瘍内分布は，間質部には CD4 陽性の T 細胞が，腫瘍細胞間には CD8 陽性 T 細胞が多く浸潤しているとの報告もある[40]．TIL は IL-2 レセプターに対する抗体で10%以下しか染色されず，その活性は抑制されていることが示唆される[41]．Wong ら[42]は CD4 陽性の TIL は IL-2 存在下で培養すると K562 細胞と Daudi 細胞に対して20%以上の細胞傷害活性を示すが，CD8 陽性の TIL は K562 細胞に対して20%以上の細胞傷害活性を示すものの，Daudi 細胞には活性を示さなかったと報告している．Miescher ら[43]は TIL をクローン培養して，CD4 陽性の TIL の57%はrIL-2 産生能をもち，CD8 陽性の TIL の93%が細胞傷害活性を示すことより，増殖した TIL は培養前の機能を維持していると報告している．これらのことより TIL を用いた養子免疫療法による治療効果が期待できる．

著者は TIL のシミュレーションにおいて，TIL モデルのアロジェニック標的細胞に対する初期 CTL 活性が NK 活性 (NK-LAK 活性) よりも LAK 活性に対してより強い相関を示すことから，TIL を IL-2 存在下で培養して誘導された作働細胞群は NK よりもむしろ CTL 及び LAK 類似の活性をもつとの結論を得た．このことは TIL を培養すると，CD8 陽性 T 細胞が有意に増加したことと矛盾しないと考えられる．したがって，現在各施設で用いられている培養プロトコールによって誘導されるリンパ球の細胞傷害活性はほとんどの場合 LAK 類似の細胞傷害活性をもつと考えられ，特異的 CTL 活性をもつリンパ球は優位でないと推定される．最近のリンパ球の表面マーカーの研究によると，IL-2 存在下で培養した時，活性化される TIL は LAK 細胞というよりもむしろ，CD8 陽性の CTL が大多数であると示唆されている[44]~[46]．以上の報告を併せ考察すると，TIL に存在する抗腫瘍細胞傷害活性をもつ T 細胞は高度に感作され，極めて特異性の高い細胞傷害活性を持つ CTL よりむしろ，感作初期の特異性があまり限局されていない T 細胞集団の可能性が示唆された．今後，癌組織内に浸潤するリンパ球の生体における意義などがさらに詳細に明らかにされるものと思われる．

また，シミュレーション実験においても実際の TIL と同じく病期が進むにしたがって，細胞傷害活性が低下する傾向を認めた．さらに混合培養によってアロジェニック作働細胞に対する CTL 活性は有意に上昇した．しかし，NK 活性，LAK 活性は培養前後で有意差がなく，むしろ低下する傾向さえも認めた．混合培養によって，一緒に培養した標的細胞に対する傷害活性が上昇することは stimulated-LAK における傷害活性の上昇を裏付けている．

Kradin ら[47]は TIL を IL-2 とともに全身投与して，悪性黒色種，腎細胞癌には効果のあった症例もあったが，肺癌には効果がなかったと報告している．著者は癌性胸膜炎の肺癌患者の胸水より TIL を分離し，rIL-2 存在下にて培養して rIL-2 とともに胸腔内に戻す方法にて，養子免疫療法を試みたが，3 例行い，2 例で胸水の消失を認めた．また，Yasumoto ら[48]は癌性胸膜炎の患者胸腔内に IL-2 を注入し，胸腔内に LAK 細胞が誘導され，臨床効果がえられたと報告している．しかし，胸水消失がどのような機序によるものか，果たして TIL-LAK 作用によるものかどうかは断定しがたく，これからの更なる検討が必要である．

癌巣内には末梢血やリンパ節より，多くのプレキラー T 細胞が存在しているが，種々の抑制機構が存在するために，キラー T 細胞への成熟，増殖が抑制されている．しかし，癌巣局所に認められる免疫抑制は可逆的であり，IL-2 存在下の培養によって，TIL は CTL もしくは LAK 類似の活性を持つようになりうる．したがって，培養 TIL を AT と混合培養し，大量培養を試みることによって，AT に高い特異性をも

つ T 細胞を分離し，NK や LAK 細胞に感受性のない腫瘍に対しても養子免疫療法に使用することが可能であると考えられる．

結　　論

肺癌患者に対する補助療法の1つとして TIL-LAK 細胞を用いた養子免疫療法を行なうことを前提として，各種リンパ球を用いた培養実験を行った．また，実際に癌性胸膜炎の患者で LAK 細胞を用いた養子免疫療法を試みた．これらの研究より，以下の結論を得た．

1．TIL の NK 活性は RLNL とともに PBL に比較して有意に低く，NK 細胞自体による抗腫瘍活性は著明に抑制されていた．

2．TIL の NK 活性，LAK 活性，AT に対する細胞傷害活性は OK-432 あるいは rIL-2 存在下にて培養すると，20％以上の活性を得ることができたが，rIL-2 存在下で培養した RLNL や PBL と比較すると有意に低かった．

3．TIL のシミュレーションではアロジェニック作働細胞のアロジェニック標的細胞に対する CTL 活性は，NK 活性よりもむしろ LAK 活性に対して強い相関関係を示し，TIL の反応性に類似した．このことより，TIL より誘導された作働細胞群は NK 細胞よりも CTL および LAK 細胞類似の活性をもつことが示唆される．

4．TIL の表面マーカーは T 細胞優位であり，マクロファージや B 細胞，さらには NK 細胞のマーカーをもつものは少数であった．培養によって T 細胞の割合がふえ，特に CD8 陽性細胞が有意に増加した．このことより，TIL の細胞傷害活性は特異性が比較的限定されていない CTL および LAK 類似の活性であることが示唆される．

5．癌性胸膜炎患者の胸腔内に TIL-LAK 細胞＋rIL-2 を注入し，胸水の消失を認めた．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜りました恩師岩喬教授に心から謝意を表します．また，直接御指導，御鞭撻を賜りました第1外科渡辺洋宇助教授，本学がん研究所分子免疫部右田俊介教授，同免疫生物部坂井俊之助助教授，統計処理に対して貴重な御助言を賜りました本学衛生学橋本和夫教授に深謝いたします．さらに本研究遂行に際し，多大な御協力を頂きました本学輸血部塩原信太郎講師，安江静香氏ならびに第1外科肺グループの諸先生に厚く御礼申し上げます．

なお，本論文の要旨は，第11回癌免疫外科研究会（弘前，1990），第31回日本肺癌学会（東京，1990）において発表した．

文　　献

1） **Watanabe, Y. & Iwa, T.:** Clinical value of immunotherapy for lung cancer by the streptococcal preparation OK-432. Cancer, **53,** 248-253 (1984).

2） **Watanabe, Y., Hashizume, Y., Shimizu, J., Yoshida, M., Watanabe, S., Iwa, T., Sakai, S., Migita, S., Sato, H., Murayama, T., Koshimura, S. & Saito, M.:** Functional character and augmentation of lymphocytes in regional lymph nodes of patients with lung cancer. Am. Rev. Respir. Dis., **142,** 769-774, (1990).

3） **Watanabe, Y. & Iwa, T.:** Clinical value of immunotherapy with the streptococcal preparation OK-432 in non-small cell lung cancer. J. Biol. Response Modif., **6,** 169-180 (1987).

4） **Watanabe, Y., Shimizu, J., Hashizume, Y., Tsunamura, Y., Yamada, T., Yoshida, M., Iwa, T., Sakai, S., Sato, H., Migita, S., Murayama, T., & Koshimura, S.:** Immunotherapy for lung cancer; Final results of prospective randomized study, changes of immunological parameters, and new horizen of treatment. *In* M. Torisu & T. Yoshida (eds.), New Horizons of Tumor Immunotherapy. 1st ed. p.597-615. Excerpta Medica, Amsterdam, 1989.

5） **渡辺洋宇，清水淳三，吉田正之，橋爪泰夫，山田哲司，岩　喬：**肺癌に対する OK-432 免疫療法－現状と将来－．日外会誌，**9,** 1432-1435 (1989).

6） **Rosenberg, S. A. & Mulé, J. J.:** Immunotherapy of cancer with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. Surgery, **98,** 437-444 (1985).

7） **Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitmann, S., Chang, A. E., Vetto, J. T., Steipp, C. A. & Simpson, C.:** A new approuch to the therapy of cancer based on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. Surgery, **100,** 262-272 (1986).

8） **橋爪泰夫：**肺癌患者末梢血および局所リンパ節リンパ球の抗腫瘍活性の誘導に関する研究．十全医会誌，**95,** 251-267 (1986).

9） **清水淳三：**肺癌の免疫療法に関する研究－特に腫瘍局所における抗腫瘍活性の誘導とその応用に関する

研究－．十全医会誌，**98,** 161-174 (1989).

10) Rosenberg, S. A., Spiess, P. & Lafreniere R.: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. Science, **233,** 1318-1321 (1986).

11) 日本肺癌学会: 臨床・病理肺癌取扱い規約．改訂第3版，15-21頁，金原出版，東京，1987.

12) Vose B. M.: Cytotoxicity of adherent cells associated with some human tumours and lung tissues. Cancer Immunol. Immunother., **5,** 173-179 (1978).

13) Strausser, J. L., Mazumder, A., Grimm, E. A., Lotze, M. T. & Rosenberg: Lysis of human solid tumors by autologous cells sensitized in vitro tumor alloantigens. J. Immunol., **127,** 266-271 (1981).

14) 木村秀樹，山口 豊，小橋貞男，由佐俊和，関根康雄: 原発性肺癌に対する気管支動脈内 St-LAK cell 注入．癌と化学療法，**15,** 2401-2404 (1988).

15) 木村秀樹，山口 豊，藤沢武彦，馬場雅行，柴光年，由佐俊和，山川久美，小幡貞男: 肺腫瘍に対する IL-2, LAK cell による養子免疫療法．Biotherapy, 2, 1131-1137 (1988).

16) 吉田政之: 肺癌患者末梢血リンパ球の抗腫瘍活性の誘導に関する研究－特に自己腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性について－．十全医会誌，**99,** 815-826 (1990).

17) Vose, B. M. & Moore, M.: Suppressor cell activity of lymphocytes infiltrating human lung and breast tumours. Int. J. Cancer, **24,** 579-585 (1979).

18) Anderson, T. M., Ibayashi, Y., Tokuda, Y., Colquhoun, S., Holmes, C. & Golub, S. H.: Natural killer activity of lymphocytes infiltrating human lung cancers following preoperative systemic recombinant interleukin 2. Arch. Surg., **122,** 1446-1449 (1987).

19) 森 良之，高橋雄三，東みゆき，冨塚清二，和気不二夫，藤林孝司，榎本昭二: 腫瘍組織浸潤リンパ球 (TIL) からの rIL-2 による細胞傷害活性の誘導．Biotherapy, **3,** 80-84 (1989).

20) Pisani, R. J., Krco, C. J., Wold, L. E. & McKean, D. J.: Lymphokine-activated killer (LAK) cell activity in tumor-infiltrating lymphocyte from non-small cell lung cancer. Am. J. Clin. Pathol., **92,** 435-446 (1989).

21) Sone, S., Inamura, N., Nii, A. & Ogura, T.: Heterogeneity of human lymphokine (IL-2)-activated killer (LAK) precursors and regulation of their LAK induction by blood monocyte. Int. J. Cancer, **42,** 428-434 (1988).

22) Savary, C. A. & Lotzova, E.: Suppression of killer cell cytotoxity by splenocytes from corynebacterium parvum-injected, bone marrow-tolerant, and infant mice. J. Immunol., **120,** 239-243 (1978).

23) 杉之下俊彦，泉 孝秀: 肺癌症例における免疫機能不全－特に血清中の免疫抑制因子とその作用について－．医療，**36,** 305-314 (1982).

24) 西條長宏: 人末梢リンパ球 Natural Killer 活性の分析と原発性肺癌，転移性肺腫瘍における変動．日癌治会誌，**15,** 362-374 (1980).

25) 湊 長博: NK 活性発現に影響する諸因子．臨床免疫．**16,** 382-391 (1984).

26) 岩崎勝利，大原守弘，斉藤孝一，森藤隆夫，粕川禮司，元木良一，阿部力哉: 担癌患者における LAK 活性－単球の影響ならびに手術前後での比較－．消化器と免疫，**21,** 175-178 (1988).

27) 辻 和男，阿保七三郎，工藤 保，橋本正治，川村義宏: 食道癌患者における Natural Killer 活性値の臨床的意義：日消外会誌，**18,** 8-14 (1985).

28) Hakim, A. A.: Peripheral blood lymphocytes from patients with cancer lack interleukin-2 receptors. Cancer, **61,** 689-701 (1988).

29) Niitsuma, M., Golub, S. H., Edelstein, R. & Holmes, E. C.: Lymphoid cells infiltrating human pulmonary tumors: Effect of intralesional BCG injection. J. N. C. I., **67,** 997-1003 (1981).

30) Holmes, E. C.: Immunology of tumor infiltrating lymphocytes. Ann. Surg., **201:** 158-163 (1985).

31) Shimokawara, I., Imamura, M., Yamanaka, N., Ishii, Y. & Kikuti, K.: Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance: An immunoperoxidase study with anti-human T-and B-cell sera. Cancer, **49,** 1456-1464 (1982).

32) 光永伸一郎，木村秀樹，山口 豊: 原発性肺癌における腫瘍細胞および腫瘍内浸潤リンパ球の数量的解析の試み．日癌治，**23,** 1467-1472 (1988).

33) Hoe, D. S., Whiteside, T. L., Johnson, J. T., Chen, K., Barnes, E. L. & Herberman, R.

B.: Long-term interleukin 2-dependent growth and cytotoxic activity of tumor-infiltrating lymphocyte from human squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer Res., **47**, 6353-6362 (1987).

34) **石井良文**: 腫瘍患者におけるリンパ球動態－癌巣内リンパ球を中心に－. 臨床免疫, **20**, 645-648 (1988).

35) **佐藤雄一**: 浸潤リンパ球, 組織球のサブセット同定による肺癌局所の免疫応答の検討. 病理と臨床, **3**, 89-96 (1985).

36) **Yano, T., Yasumoto, K., Togami, M., Ishida, T., Kimura, G., Sugimachi, K. & Nomoto, K.**: Properties of recombinant interleukin 2-cultured tumor-infiltrating lymphocytes in human lung cancer. Int. J. Cancer, **43**, 619-623 (1989).

37) **Takeo, S., Yasumoto, K., Nagashima, A., Nakahashi, H., Sugimachi, K. & Nomoto, K.**: Role of tumor associated macrophages in lung cancer. Cancer Res., **46**, 3179-3182 (1986).

38) **Sone, S., Utsugi, T., Nii, A. & Ogura, T.**: Effect of human alveolar macrophages on the induction of lymphokine (IL-2)-activated killer cells. J. Immunol., **139**, 29-34 (1987).

39) **Yasumoto, K., Takeo, S., Yano, T., Nakahashi, H., Nagashima, A., Sugimati, K. & Nomoto, K.**: Role of tumor-infiltrating lymphocytes in the host defense mechanism against lung cancer. J. Surg. Oncol., **38**, 221-226 (1988).

40) **Hoe, D. S., Whiteside, L., Johnson, J. T., Chen, K., Barnes, E. L. & Herberman, R. B.**: Long-term interleukin 2-dependent growth and cytotoxic activity of tumor-infiltrating lymphocytes from human squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer Res., **47**, 6353-6362 (1987).

41) **Strauchen, J. A. & Breakstone, B. E.**: IL-2 recepter expression in human lymphoid lesions: Immunohistochemical study of 166 caces. Am. J. Pathol., **126**, 506-512 (1987).

42) **Wong, J. T., Pinto, C. E., Gifford, J. D., Kurnick, J. T. & Kradin, R. L.**: Characterization of the $CD4^+$ and $CD8^+$ tumor infiltrating lymphocytes propagated with bispecific monoclonal antibodies. J. Immunol., **143**, 3404-3411 (1989).

43) **Miescher, S., Stoeck, M., Qiao, L., Barras, C., Barrelet, L. & von Fliedner, V.**: Preferential clonogenic deficit of CD8-positive T-lymphocytes infiltrating human solid tumor. Cancer Res., **48**, 6992-6998 (1988).

44) **Finke, J. H., Rayman, P., Alexander, J., Ediger, M., Tubbs, R. R., Connelly, R., Pontes, E. & Bukowski, R.**: Characterization of the cytolytic activity of $CD4^+$ and $CD8^+$ tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell carcinoma. Cancer Res., **50**, 2363-2370 (1990).

45) **Miescher, S., Stoeck, M., Barras, C., Barrelet, L. & von Fliedener, V.**: Proliferative and cytolytic potentials of purified human tumor--infiltrating lymphocytes. Impaired response to mitogen-driven stimulation despite T-cell recepter expression. Int. J. Cancer, **42**, 659-666 (1988).

46) **稲村典昭, 曽根三郎, 楊河宏章, 仁井昌彦, 小倉剛**: LAK 細胞とその臨床応用. 呼吸, **7**, 304-309 (1988).

47) **Kradin, R. L., Kurnick, J. T., Lazarus, D. S., Preffer, F. I., Dubinett, S. M., Pinto, C. E., Gifford, J., Devidson, E., Grove, B., Callahan, R. J. & Strauss, H. W.**: Tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in treatment of advanced cancer. Lancet, **1**, 577-580 (1989).

48) **Yasumoto, K., Miyazaki, K., Nagasima, A., Ishida, T., Kuda, T., Yano, T., Sugimati, K. & Nomoto, K.**: Induction of lymphokine-activated killer cells by intrapleural instillations of recombinant interleukin-2 in patients with malignant pleurisy due to lung cancer. Cancer Res., **47**, 2184-2187 (1987).

Studies on Tumoricidal Activity of Tumor-infiltrating Lymphocytes and its application to lung cancer patients

Shin-ichirou Watanabe, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920

J. Juzen Med. Soc., **99**, 947 − 962 (1990)

Key words interleukin-2, lymphokine activated killer cell, antigen-specific cytotoxic T lymphocytes, tumor-infiltrating lymphocyte, adoptive immunotherapy

Abstract

In the present study an attempt was made to characterize tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) with the eventual aim of clinical application for effective adoptive immunotherapy for lung cancer patients. As immunological parameters, natural killer (NK) cell activity, lymphokine activated killer (LAK) cell activity, cytotoxicity against autologous tumor (AT) cells and surface markers of lymphocytes were evaluated. The results showed NK activity of both regional lymph node lymphocytes (RLNLs) and TILs was apparently low in comparison with that of PBLs (peripheral blood lymphocytes). Substantial augmentation (>20%) of the cytotoxic activity against the K562, Daudi and autologous cell lines were induced by incubating the TILs with OK-432 or rIL-2, although these enhancement of the cytotoxicity was significantly low in comparison with that of the RLNLs and PBLs. By analysis of lymphocyte subsets, it was clarified that the majority of the TILs were T cells (most of them were $CD8^+$ cells), whereas B cells, macrophages and NK cells were minority. The TILs induced by either rIL-2 or OK-432 had a potent activity to lyse AT cells but not autologous blastoid lymphocytes. These results strongly indicated that, if not at all, some part of cultured TIL containes cytotoxic T lymphocyte which have a specificity against autologous tumor cells. Accordingly, it was thought to be probable that some of the cytotoxic T cells (CTLs) in the TILs might have cytotoxicity against AT cells. Therefore, the cytotoxic activity of TILs was further analysed by simulation study using allogenic effector and traget cells. By the simulation study it was clarified that the cytotoxic activity of effector cells in the TILs correlated more with the LAK cell activity than with the NK cell activity. From the results of the present study, it was concluded that the incubation of the TILs induced LAK cell activity and cytotoxic T lymphocyte against AT cells. Thus, the cytotoxic activity of TILs against AT cells can consist with those of LAK cells as well as CTLs. Adoptive immunotherapy (AIT) was tried on lung cancer patients with carcinomatous pleurosy. TILs were extracted from pleural effusion, and enhanced by rIL-2. The enhanced TILs with rIL-2 were infused into the thoracic cavity, and subsequently in two out of three cases the pleural effusion disappeared.